

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06590

研究課題名(和文) 脂質ラフトをターゲットとする新たな局所麻酔薬の作用機構の提唱

研究課題名(英文) Lipid raft-based mechanism of the local anesthetic action

研究代表者

木下 祥尚 (Kinoshita, Masanao)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：40529517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年我々はモデル膜を用いて局所麻酔薬が脂質ラフトの形成を阻害することを報告した。本研究では局所麻酔薬が実際の神経芽細胞腫細胞膜に形成されるラフトに及ぼす影響を調査した。まず脂質ラフトと周囲の流動的な膜領域を二色の蛍光脂質で標識した。この細胞に局所麻酔薬を作用させるとフェルスタ共鳴エネルギー移動(FRET)が増加した。次に、ラフトの主要構成脂質であるスフィンゴミエリン(SM)の拡散係数を算出したところ麻酔薬存在下で可逆的に拡散係数が増加することが分かった。拡散係数は蛍光分子を含むクラスタサイズと負に相関するため、本結果は局所麻酔薬がラフトの形成を抑制することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで局所麻酔薬の作用機序はイオンチャネルとの直接的な相互作用に帰着されてきた。一方、本研究では局所麻酔薬が脂質ラフトに作用することでチャネルを不活性化させるという、ラフト標的仮説を支持する結果を得た。ここで得られた知見は、より効率的な局所麻酔薬の創薬に向けた、新たな指針を提示する。

研究成果の概要(英文)：Lipid rafts are ordered membrane domains, which work as a platform for signal transduction. Recently, our group disclosed that local anesthetics suppress the formation of the raft-like ordered domains using model membranes.

However, it is unknown whether similar results are obtained in the real cell membranes. In this study, we examined influence of local anesthetics on the lipid rafts formed in neuroblastoma cell (Neuro 2A). Firstly, lipid rafts and fluid membrane matrix were separately labeled by fluorescent lipid probes, which form a favorable Forster resonance energy transfer (FRET) pair. Interestingly, exogenous addition of local anesthetics led to increase in the FRET, indicating the enhanced miscibility of the raft and fluid matrix. Moreover, local anesthetics reversibly enhanced diffusion coefficient of lipid rafts. Since diffusion coefficients correlated inversely with the domain size, this result indicated that local anesthetics suppress the formation of lipid rafts.

研究分野：生物物理学

キーワード：脂質ラフト 局所麻酔薬 蛍光脂質プローブ 蛍光分光測定 細胞膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

局所麻酔薬の作用機序を理解することは、より効果的な麻酔薬を開発するうえで必須である。これまで局所麻酔薬はイオンチャンネルに結合することでチャンネルを不活性化し、その結果、麻酔作用が発現すると考えられてきた。一方、麻酔に関連するイオンチャンネルが細胞膜に存在する機能的膜領域「脂質ラフト」に局在することが明らかになっている。また、ラフトを阻害するとチャンネルの活性が低下するという報告もあり、局所麻酔薬の作用機序は完全に解明されていない。近年、我々のグループではラフト様秩序相と周囲の流動的な膜領域が相分離したモデル膜を用いることで、局所麻酔薬が脂質ラフトの形成を阻害することを明らかにした。この結果を基に、申請者は局所麻酔薬が脂質ラフトの形成を阻害することで、間接的に、チャンネルの活性を阻害するのではないかと考えた(ラフト標的仮説; 図1)。しかし、実際の細胞膜でも同じ結果が得られるかどうかはわかっていない。

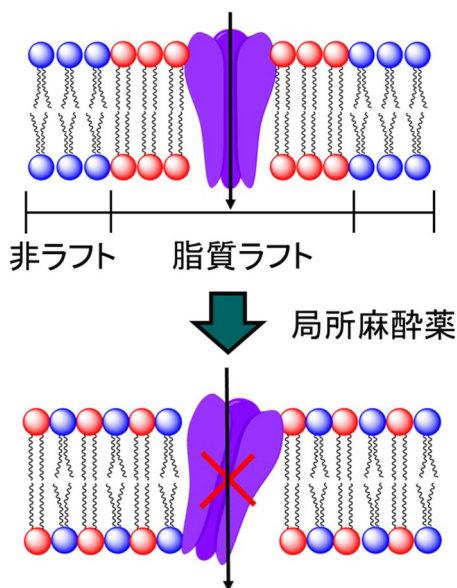


図1. ラフト標的仮説の模式図

2. 研究の目的

このような状況下、実際の細胞膜を用いた再現性の確認が不可欠である。しかし、細胞に形成される脂質ラフトは小さく(直径; ~20 nm)、その動的性質(寿命; < 1s)故、分析困難な研究対象であり、局所麻酔薬が脂質ラフトに及ぼす影響は明らかになっていない。本研究では、局所麻酔薬の新たな作用機序「ラフト標的仮説」の提唱を目的として、局所麻酔薬がマウス神経芽細胞腫(Neuro-2a)の生体膜に形成する脂質ラフトに及ぼす影響を調査した。

3. 研究の方法

一般に、脂質ラフトは小さく動的な構造故、光学顕微鏡で直接的に観察することができない。本申請では、応募者らが独自に開発した脂質の分布や拡散挙動を高精度で再現する脂質プローブ(図2)を用いた Forster 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により、局所麻酔薬が脂質ラフトに及ぼす影響を調査した。本実験ではラフトの主要成分であるスフィンゴミエリンに対して緑色や赤色の蛍光物質を結合したプローブ(488neg-SM や 594neg-SM; neg-SM と総称)を用いてラフトを標識する。一方、ラフトを取り巻く流動的な膜領域は不飽和リン脂質 dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)の蛍光標識体(488neg-DOPC や 594neg-DOPC; neg-DOPC と総称)を用いて標識する。

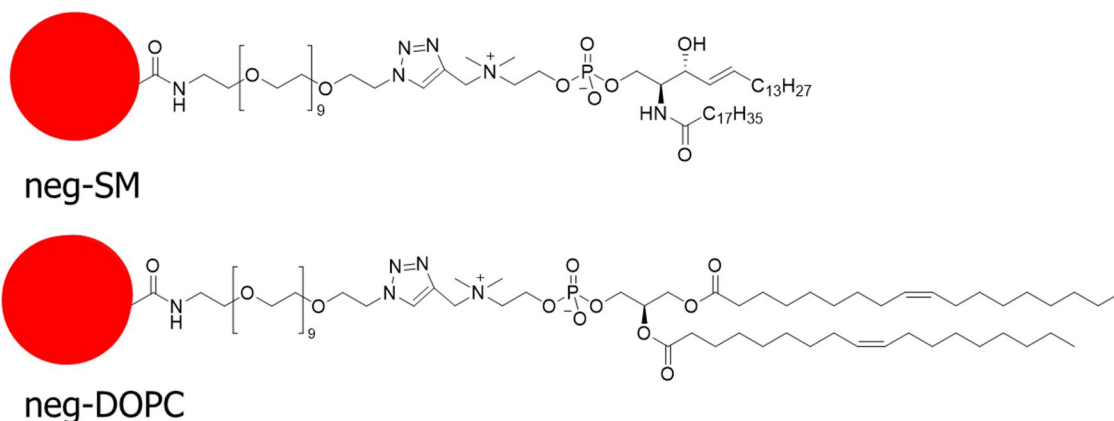


図2. 蛍光 SM プローブ(neg-SM)および DOPC プローブ(neg-DOPC)の化学構造

4. 研究成果

488neg-SM(ラフトマーカー)と 594neg-DOPC(非ラフトマーカー)を導入した細胞膜を用いて、麻酔薬を添加する前と後の FRET 効率(それぞれ、 $R_{\text{FRET-LA}}$  と  $R_{\text{FRET+LA}}$ )の比を測定した(図3)。ここでは麻酔薬非存在下での FRET 効率を 100%とし、チャンネルの不活性化が

確認されている濃度の麻酔薬を添加したときの FRET 効率と比較した。その結果、リドカイン、テトラカインおよびブピバカイン存在下で、FRET 効率が、それぞれ 17%、12%、11%増大することが分かった。この結果は SM の DOPC の混和性が増加することを示しており、局所麻酔薬が脂質ラフトの形成を抑制するというモデル膜系の結果と一致している。

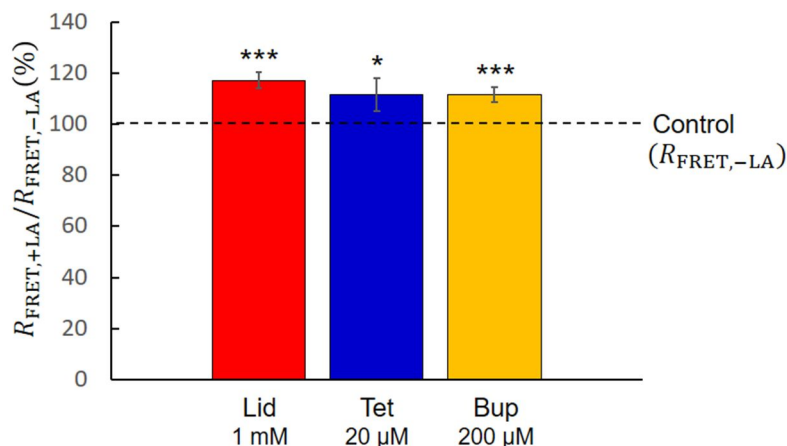


図 3 局所麻酔剤による FRET 効率の変化。  $R_{FRET,+LA}$  と  $R_{FRET,-LA}$  は、それぞれ、麻酔薬添加前後での FRET 効率。  $R_{FRET,-LA}$  値を 100% とした。(赤) 1 mM リドカイン、(青) 20 μM テトラカイン、(黄) 200 μM ブピバカイン添加後の FRET 効率の増加率。エラーバーは標準誤差を示す ( $N=20$ )。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ 。

この結果を支持するため、蛍光相関分光法により 594neg-SM の拡散係数を算出した。ここで、594neg-SM は脂質ラフトに取り込まれるため、その拡散係数は細胞膜中での脂質ラフトの拡散係数を反映する。また、Saffman-Delbrueck の関係式より拡散係数はドメインサイズと負に相関することが知られ、これはラフトを形成しない 594neg-DOPC ( $0.50 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) の拡散係数が 594neg-SM ( $0.39 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) の拡散係数に比べて有意に小さいことから示唆される (図 4)。この手法を用いて、局所麻酔剤添加によるラフトのサイズ変化を評価したところ、リドカイン存在下での拡散係数は  $0.45 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、テトラカイン存在下では  $0.49 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、ブピバカイン存在下では  $0.47 \mu\text{m}^2/\text{s}$  となり、局所麻酔剤存在下で拡散係数が増加した (図 4a)。この結果は、局所麻酔剤添加により脂質ラフトの形成を抑制するという、FRET 測定の結果を支持している。さらに、この変化は可逆であり、細胞を洗浄することで麻酔薬を除去すると、拡散係数が元に戻ることも確認している。一方、594neg-DOPC 拡散係数は、いずれの局所麻酔薬についても有意な拡散係数の変化は確認されなかった (図 4b)。これは、局所麻酔薬がラフトを取り巻く周囲の膜領域の流動性には顕著な影響を与えないことを示している。

しかし、なぜラフトの形成を抑制することで、イオンチャネルが不活性化するかについても未解明なままである。今後は、これらの問題の解決を図り、ラフト標的仮説の実証を目指す。

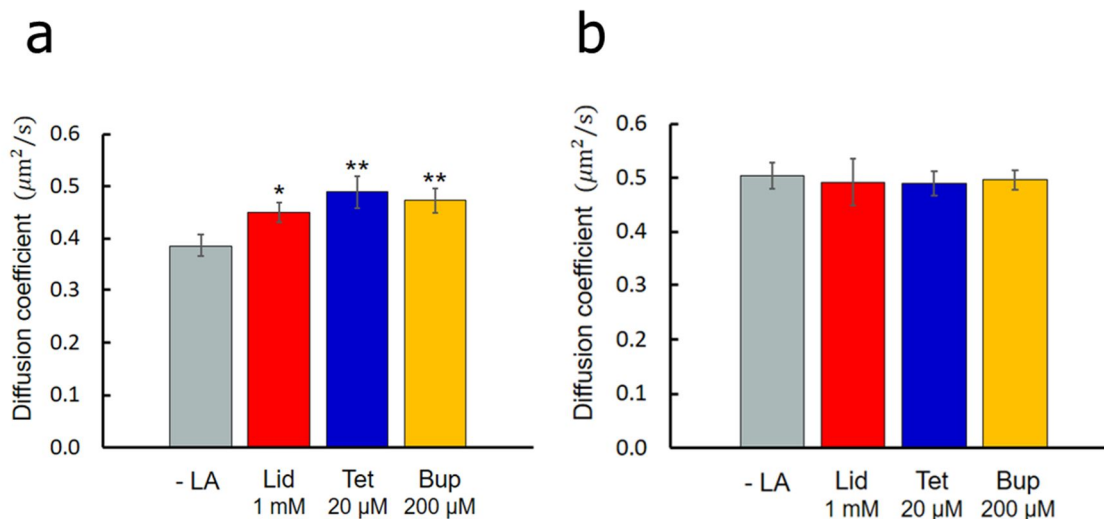


図 4 局所麻酔剤の添加による 594neg-SM(a)、594neg-DOPC(b)の拡散係数の変化  
(グレー)麻酔剤添加前、(赤)1 mM リドカイン、(青)20  $\mu$ M テトラカイン、(黄)200  $\mu$ M プピ  
バカイン 200  $\mu$ M 添加後の拡散係数。エラーバーは標準誤差( $N=30$ )。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ ,  
\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 木下祥尚 松森信明	4. 巻 48
2. 論文標題 脂質ラフトをターゲットとする局所麻酔薬の作用機序	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 50-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hieda Manami, Tsujimura Koya, Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki	4. 巻 95
2. 論文標題 Formation of a Tight Complex between Amphidinol 3 and Sterols in Lipid Bilayers Revealed by Short-Range Energy Transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1753 ~ 1759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20220273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Kana, Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Impact of sphingomyelin acyl chain heterogeneity upon properties of raft-like membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184036 ~ 184036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2022.184036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita Masanao, Matsumori Nobuaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Inimitable Impacts of Ceramides on Lipid Rafts Formed in Artificial and Natural Cell Membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 727 ~ 727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/membranes12080727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yasuhiro Tanaka, Masanao Kinoshita, Nobuaki Matsumori
2. 発表標題 Effects of local anesthetics on lipid rafts formed in live cell-membranes
3. 学会等名 日本化学会第101回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中康裕、木下祥尚、松森信明
2. 発表標題 局所麻酔剤が細胞膜に形成される 特異的膜領域「脂質ラフト」に及ぼす影響
3. 学会等名 日本化学会第101回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学研究院化学部門生体分析化学研究室ホームページ <a href="http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/BioanaIChem/achievement.html">http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/BioanaIChem/achievement.html</a>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------